

**PATENT ABSTRACTS OF JAPAN**

(11)Publication number : 2004-187563

(43)Date of publication of application : 08.07.2004

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70

G01N 33/53

G01N 33/566

(21)Application number : 2002-358607

(71)Applicant : PEPTIDE DOOR CO LTD

(22)Date of filing : 10.12.2002

(72)Inventor : SUZUKI MASATSUGU  
TSUNODA HIROYUKI  
KOBAYASHI TOMOMI  
MATSUMOTO MEGUMI**(54) METHOD FOR DETECTING IgG USING PEPTIDE BINDABLE TO LgG OR PHAGE PRESENTED WITH THE PEPTIDE ON THE SURFACE**

(57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a method for detecting IgG using as a detective means a new peptide bindable to the Fc fragment of IgG or a phage presented with the peptide on the surface.

**SOLUTION:** Using the Fc fragment of IgG derived from various animals as a target substance, a screening is carried out by phage display method and the amino acid sequence of the peptide bindable to the target substance is identified. The peptide having the thus obtained specific amino acid sequence or an amino acid sequence selected from those modified, amino acid residue-substituted, inserted and/or deleted in the above amino acid sequence on condition that the bindability of IgG to the Fc fragment is not impaired, or the phage presented with the peptide on the surface, is used as the detective means for the IgG.

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-187563

(P2004-187563A)

(43) 公開日 平成16年7月8日(2004.7.8)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

C 1 2 Q 1/70

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

F I

C 1 2 Q 1/70

G 0 1 N 33/53

G 0 1 N 33/566

Z N A

N

テーマコード (参考)

4 B 0 6 3

審査請求 未請求 請求項の数 12 O L (全 264 頁)

(21) 出願番号 特願2002-358607 (P2002-358607)  
(22) 出願日 平成14年12月10日 (2002.12.10)(71) 出願人 502305238  
株式会社ペプタイドドア  
群馬県高崎市緑町1-25-5 丸九緑町  
ビル206号  
(74) 代理人 100086689  
弁理士 松井 茂  
(72) 発明者 鈴木 政嗣  
群馬県高崎市中居町443-1 グリー  
ンハイツN o 2 101号  
(72) 発明者 角田 宏幸  
群馬県前橋市関根町3-26-14 10  
2号 レトア小見  
(72) 発明者 小林 友美  
群馬県高崎市片岡町3-21-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 I g Gに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示したファージを用いたI g Gの検出方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 I g GのF cフラグメントに結合性を有する新規なペプチド又は該ペプチドを表面に呈示したファージを検出手段として用いたI g Gの検出方法を提供する。

【解決手段】 各種動物由来のI g GのF cフラグメントをターゲット物質として用い、ファージディスプレイ法によりスクリーニングを行い、該ターゲット物質に結合性を有するペプチドのアミノ酸配列を同定する。このようにして得られた特定のアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてI g GのF cフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージをI g Gの検出手段として用いる。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

配列番号1～164で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることを特徴とするIgGの検出方法。

## 【請求項2】

配列番号1～87で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するヒト由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。 10

## 【請求項3】

配列番号88～90で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するウマ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。

## 【請求項4】

配列番号91～93で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するヒツジ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。 20

## 【請求項5】

配列番号94～97で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するウサギ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。 30

## 【請求項6】

配列番号98～104で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するモルモット由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。

## 【請求項7】

配列番号105～108で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するヤギ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。 40

## 【請求項8】

配列番号109～131で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するネコ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いる、請求項1に記載のIgGの検出方法。

## 【請求項9】

配列番号 1 3 2 ～ 1 5 1 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するイヌ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g G の検出手段として用いる、請求項 1 に記載の I g G の検出方法。

【請求項 1 0】

配列番号 1 5 2 ～ 1 5 6 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するウシ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g G の検出手段として用いる、請求項 1 に記載の I g G の検出方法。 10

【請求項 1 1】

配列番号 1 5 7 ～ 1 6 2 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するブタ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g G の検出手段として用いる、請求項 1 に記載の I g G の検出方法。

【請求項 1 2】

配列番号 1 6 3 ～ 1 6 4 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するマウス由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g G の検出手段として用いる、請求項 1 に記載の I g G の検出方法。 20

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、I g G の F c フラグメントに結合性を有する新規なペプチド又は該ペプチドを表面に呈示したファージを用いた I g G の検出方法に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

免疫反応の中心的な役割を担うタンパク質である抗体は、従来から医療や臨床診断をはじめとする幅広い分野で利用されている。 30

【0 0 0 3】

例えば、抗体は、微量物質を特異的に検出・測定する手段として広く利用されており、酵素免疫測定法や蛍光免疫測定法等に用いられている。これらの測定方法は、ターゲット物質に結合する抗体（一次抗体）と、前記一次抗体に結合する抗体であって、蛍光物質や酵素等で標識された抗体（二次抗体）を用いてターゲット物質を検出する方法であり、検査薬に応用されているほか、医学・薬学・生化学分野等の研究に欠くことのできないものとなっている。

【0 0 0 4】

一般的な抗体の作製方法としては、マウス、ウサギ、ヒツジ等の動物に抗原を接種して免疫することによって抗血清を調製し、その抗血清からポリクローナル抗体を精製する方法、ハイブリドーマをマウス等の腹腔にて増殖させ、モノクローナル抗体を含む腹水を調製し、その腹水から抗体を精製する方法、ハイブリドーマを血清培地や無血清培地中で培養してモノクローナル抗体を含む培養液を調製し、その培養液から抗体を精製する方法等がある。 40

【0 0 0 5】

一方、近年、ファージディスプレイ法によるターゲット物質に対して結合性を有するペプチドのスクリーニングも行われており、例えば、非特許文献 1 には、ヒト I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドとして、配列番号 2 8 1 ～ 2 8 7 で表されるアミノ 50

酸配列を有するペプチドが報告されており、これらのペプチドが、分析や医薬用途の抗体の精製工程におけるアフィニティリガンドとして利用できる可能性があることが記載されている。

【0006】

【非特許文献1】

Journal of Immunological Methods 221 (1998) 151-157

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記の方法による抗体の作製はいずれも非常に手間がかかり、また、大量調製も難しいため、抗体作製のコストが高くなってしまいうという問題があった。また、二次抗体として用いられる抗IgG抗体は、検出感度を上げるために多点で一次抗体に結合するポリクローナル抗体であることが望ましいが、ポリクローナル抗体を作製するためには動物を用いる必要があるため、得られる抗IgG抗体の結合力等にばらつきを生じやすく、一定品質の抗体を安定供給しにくいという問題があった。更に、抗体を作製する毎に動物を屠殺しなければならないという倫理上の問題もあった。

【0008】

一方、上記のようなIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドは、化学合成することができるので、一定品質のペプチドを安定して低コストで供給できるだけでなく、動物を使用しないので倫理上の問題もないといった利点を有しているが、上記非特許文献1に記載されたペプチド以外にIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドは報告されていない。

【0009】

したがって、本発明の目的は、IgGのFcフラグメントに結合性を有する新規なペプチド又は該ペプチドを表面に呈示したファージを検出手段として用いたIgGの検出方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するため、本発明のIgGの検出方法は、配列番号1～164で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることを特徴とする。

【0011】

本発明の検出方法によれば、IgGの検出手段として、配列番号1～164で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを用いることにより、従来の抗IgG抗体を用いた検出系に比べて、より安価なIgGの検出系を提供できる。また、抗IgG抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したIgGの検出系を提供できる。すなわち、上記ペプチドは化学合成により簡単に合成でき、また、上記ペプチドを表面に呈示しているファージは大腸菌等に感染させることにより簡単に増幅することができるので、一定品質のものを大量、かつ安価に調製することができる。

【0012】

本発明の好ましい態様においては、配列番号1～87で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するヒト由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプ

チドを表面に呈示しているファージを、I g Gの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗I g G抗体を用いた検出系に比べて、より安価なヒト由来I g Gの検出系を提供できる。また、抗I g G抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したヒト由来I g Gの検出系を提供できる。

【0013】

また、別の好ましい態様においては、配列番号88～90で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてI g GのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するウマ由来I g GのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g Gの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗I g G抗体を用いた検出系に比べて、より安価なウマ由来I g Gの検出系を提供できる。また、抗I g G抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したウマ由来I g Gの検出系を提供できる。

10

【0014】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号91～93で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてI g GのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するヒツジ由来I g GのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g Gの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗I g G抗体を用いた検出系に比べて、より安価なヒツジ由来I g Gの検出系を提供できる。また、抗I g G抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したヒツジ由来I g Gの検出系を提供できる。

20

【0015】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号94～97で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてI g GのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するウサギ由来I g GのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g Gの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗I g G抗体を用いた検出系に比べて、より安価なウサギ由来I g G検出系を提供できる。また、抗I g G抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したウサギ由来I g Gの検出系を提供できる。

30

【0016】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号98～104で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてI g GのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するモルモット由来I g GのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g Gの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗I g G抗体を用いた検出系に比べて、より安価なモルモット由来I g Gの検出系を提供できる。また、抗I g G抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したモルモット由来I g Gの検出系を提供できる。

40

【0017】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号105～108で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてI g GのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するヤギ由来I g GのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g Gの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗I g G抗体を用いた検出系に比べて、より安価なヤギ由来I g Gの検出系を提供できる。また、抗I g G抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したヤギ由来I g Gの検出系を提供できる。

【0018】

50

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号109～131で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するネコ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗IgG抗体を用いた検出系に比べて、より安価なネコ由来IgGの検出系を提供できる。また、抗IgG抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したネコ由来IgGの検出系を提供できる。

#### 【0019】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号132～151で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するイヌ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗IgG抗体を用いた検出系に比べて、より安価なイヌ由来IgGの検出系を提供できる。また、抗IgG抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したイヌ由来IgGの検出系を提供できる。

#### 【0020】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号152～156で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するウシ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗IgG抗体を用いた検出系に比べて、より安価なウシ由来IgGの検出系を提供できる。また、抗IgG抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したウシ由来IgGの検出系を提供できる。

#### 【0021】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号157～162で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するブタ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗IgG抗体を用いた検出系に比べて、より安価なブタ由来IgGの検出系を提供できる。また、抗IgG抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したブタ由来IgGの検出系を提供できる。

#### 【0022】

また、更に別の好ましい態様においては、配列番号163～164で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するマウス由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、IgGの検出手段として用いることが好ましい。これによれば、抗IgG抗体を用いた検出系に比べて、より安価なマウス由来IgGの検出系を提供できる。また、抗IgG抗体のような品質のばらつきがないので、より安定したマウス由来IgGの検出系を提供できる。

#### 【0023】

#### 【発明の実施の形態】

本発明において、IgGの検出手段として用いられるペプチドは、IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドであり、ペプチド中に配列番号1～164で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列

から選ばれたアミノ酸配列を有するものである。

【0024】

前記ペプチドは、上記の部分アミノ酸配列を有するものであれば、そのアミノ酸数は特に制限されないが、通常、アミノ酸数4～50個からなることが好ましく、アミノ酸数6～20個からなることがより好ましい。また、前記ペプチドは、IgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾（例えばアセチル化、アシル化、アミド化、カルボキシル化、リン酸化、糖鎖の付加等）、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失があってもよい。なお、前記ペプチドは、上記アミノ酸配列を複数個有していてもよい。

【0025】

本発明において、配列番号1～164で表されるアミノ酸配列は、IgGのFcフラグメントをターゲット物質として用いたファージディスプレイ法（Smith, G. P., Science, 288, 1315-1317 (1985)）によって決定されたものであるが、コンピューターソフト（日立Bio Package）を用いた解析によっても決定することができる。なお、ファージディスプレイ法は、ファージの外殻タンパク質に、ランダムなアミノ酸配列を有するペプチド（通常、アミノ酸数5～12個程度）を融合タンパク質として呈示させたファージライブラリを用いて、ターゲット物質に結合するペプチドをスクリーニングする方法である。ファージライブラリは、例えば、Smith, G. P., Science, 288, 1315-1317 (1985)、J. K. Scott and G. P. Smith, Science, 249, 386-390 (1990)等に記載された方法にしたがって、ランダム化したDNAを化学合成し、これをファージDNAの外殻タンパク質をコードする遺伝子に挿入し、このDNAを大腸菌に導入することにより調製することができる。また、ファージライブラリは市販されており、例えば、商品名「Phage Display Peptide Library Kit」、New England Biolab社製）等を用いることもできる。

【0026】

そして、ファージディスプレイ法等により決定されたアミノ酸配列に基づいて、例えば、固相法、Fmoc法等の公知のペプチド合成法により、目的とするペプチドを簡単に合成することができる。

【0027】

本発明において、IgGの検出手段として用いられるファージは、ファージの外殻タンパク質に、配列番号1～164で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドを融合タンパク質として呈示させたファージである。

【0028】

このようなファージは、基本的には、Smith, G. P., Science, 288, 1315-1317 (1985)、J. K. Scott and G. P. Smith, Science, 249, 386-390 (1990)等に記載されたファージライブラリの作製方法にしたがって得ることができる。すなわち、上記のIgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドをコードするDNAを化学合成し、このDNAをファージライブラリを作製するときと同様の方法で、ファージDNAの外殻タンパク質をコードする遺伝子に挿入し、このDNAを大腸菌に導入することにより、所望のペプチドを表面に呈示したファージを得ることができる。

【0029】

本発明において、IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドを呈示させるファージとしては、通常、ファージライブラリに用いられているファージが好ましく用いられる。このようなファージとしては、M13ファージ等の繊維状ファージ、T系ファージ等が例示できる。例えば、M13ファージの場合は、ファージの表面マイナータンパク質p



III 遺伝子に、上記 IgG のFcフラグメントに結合性を有するペプチドをコードしたDNAを挿入し、このDNAを大腸菌に導入することにより、ファージの表面マイナータンパク質pIIIに、上記IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドを融合タンパク質として呈示させたファージを得ることができる。

#### 【0030】

以下、本発明で用いられるペプチドについて詳しく説明する。

配列番号1～87で表されるアミノ酸配列は、ヒト由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、上記のようなファージライブラリを、ヒト由来IgGのFcフラグメントに接触させて選択操作（バイオパニング）を行い、ヒト由来IgGのFcフラグメントに結合するペプチドを発現したファージ群のみを選択し、このファージのDNAを解析することにより、ファージ表面に呈示されたペプチドのアミノ酸配列を同定して得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例1の表2参照）。 10

#### 【0031】

したがって、配列番号1～87で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ヒト由来IgGのFcフラグメントを特異的に認識することができるので、ヒト由来IgGの検出手段として好適に用いることができる。 20

#### 【0032】

配列番号88～90で表されるアミノ酸配列は、ウマ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、ウマ由来IgGのFcフラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例6の表5参照）。

#### 【0033】

したがって、配列番号88～90で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ウマ由来IgGのFcフラグメントを特異的に認識することができるので、ウマ由来IgGの検出手段として好適に用いることができる。 30

#### 【0034】

配列番号91～93で表されるアミノ酸配列は、ヒツジ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、ヒツジ由来IgGのFcフラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例7の表7参照）。 40

#### 【0035】

したがって、配列番号91～93で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列においてIgGのFcフラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ヒツジ由来IgGのFcフラグメントを特異的に認識することができるので、ヒツジ由来IgGの検出手段として好適に用いることができる。 40

#### 【0036】

配列番号94～97で表されるアミノ酸配列は、ウサギ由来IgGのFcフラグメントに結合性を有するペプチドであり、ターゲット物質として、ウサギ由来IgGのFcフラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことにより、アミノ酸配 50

列を同定したものである（実施例 8 の表 9 参照）。

【0037】

したがって、配列番号 94～97 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ウサギ由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、ウサギ由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。

【0038】

配列番号 98～104 で表されるアミノ酸配列は、モルモット由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、モルモット由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 9 の表 11 参照）。 10

【0039】

したがって、配列番号 98～104 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、モルモット由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、モルモット由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。 20

【0040】

配列番号 105～108 で表されるアミノ酸配列は、ヤギ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、ヤギ由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 10 の表 13 参照）。

【0041】

したがって、配列番号 105～108 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ヤギ由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、ヤギ由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。 30

【0042】

配列番号 109～131 で表されるアミノ酸配列は、ネコ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、ネコ由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 11 の表 15 参照）。 40

【0043】

したがって、配列番号 109～131 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ネコ由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、ネコ由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。

【0044】

配列番号 132～151 で表されるアミノ酸配列は、イヌ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質とし 50

て、イヌ由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 12 の表 17 参照）。

【0045】

したがって、配列番号 132～151 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、イヌ由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、イヌ由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。

10

【0046】

配列番号 152～156 で表されるアミノ酸配列は、ウシ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、ウシ由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 13 の表 19 参照）。

【0047】

したがって、配列番号 152～156 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ウシ由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、ウシ由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。

20

【0048】

配列番号 157～162 で表されるアミノ酸配列は、ブタ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、ブタ由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 14 の表 21 参照）。

【0049】

したがって、配列番号 157～162 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、ブタ由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、ブタ由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。

30

【0050】

配列番号 163～164 で表されるアミノ酸配列は、マウス由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドの共通配列である。これらの共通配列は、ターゲット物質として、マウス由来 I g G の F c フラグメントを用い、上記と同様にしてファージディスプレイ法を行うことによって得られたペプチドのアミノ酸配列を比較することにより決定したものである（実施例 15 の表 23 参照）。

40

【0051】

したがって、配列番号 163～164 で表されるアミノ酸配列、又はそれらのアミノ酸配列において I g G の F c フラグメントに対する結合性が損なわれない範囲で修飾、アミノ酸残基の置換、挿入及び／又は欠失したアミノ酸配列から選ばれたアミノ酸配列を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、マウス由来 I g G の F c フラグメントを特異的に認識することができるので、マウス由来 I g G の検出手段として好適に用いることができる。

【0052】

50

本発明においては、I g Gの検出手段として用いられる上記ペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージは、公知の方法により、蛍光物質や酵素等の標識物質を結合させてから用いることが好ましい。これにより、上記ペプチド又はファージを二次抗体の代替品として、酵素免疫測定法や蛍光免疫測定法等に利用することができるので、抗I g G抗体を用いた場合に比べて、より安価な酵素免疫測定法や蛍光免疫測定法等を提供できる。

#### 【0053】

上記蛍光物質としては、F I T C（フルオレセイン）、C y 3、C y 5、A l e x a等が例示でき、例えば「超高感度酵素免疫測定法（石川栄治著 学会出版センター）」等に記載の方法に従って、これらの蛍光物質を上記ペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージに結合させることができる。 10

#### 【0054】

また、上記酵素としては、H R P（ホースラディッシュペルオキシダーゼ）、A P（アルカリホスファターゼ）、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等が例示でき、例えば「超高感度酵素免疫測定法」（石川栄治著 学会出版センター）等に記載の方法に従って、これらの酵素を上記ペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージに結合させることができる。

#### 【0055】

例えば、上記ペプチドに標識物質を結合させる場合には、ペプチドの末端等に標識物質との結合に利用可能な適当なスペーサーを挿入してもよい。スペーサーを挿入することにより、標識物質の結合を行いやすくなると共に、スペーサーの長さを調整することにより、立体障害を回避してターゲット物質（I g GのF cフラグメント）との接触をより容易にすることができ、検出感度の向上を図ることも可能となる。例えば、スペーサーがアミノ酸やペプチドである場合は、それらのスペーサーを挿入したペプチドを簡単に合成することができるので好ましい。 20

#### 【0056】

#### 【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

#### 【0057】

#### 実施例1

（1）ヒト由来I g GのF cフラグメント（以下、h u m a n F cと略記する。）に結合性を有するペプチドのスクリーニング  
ターゲット物質として、h u m a n F cを用い、ファージディスプレイ法により、h u m a n F cに結合性を有するペプチドのスクリーニングを以下のようにして行った。なお、ファージディスプレイ法では、M 1 3ファージの表面のマイナータンパクp I I Iにペプチドがランダムに呈示されるライブラリ（呈示されるランダムアミノ酸数が7個、10個、12個のペプチドライブラリ）を、S m i t h, G. P., S c i e n c e, 288, 1315-1317 (1985)、J. K. S c o t t a n d G. P. S m i t h, S c i e n c e, 249, 386-390 (1990)等の記載に基づいて作製し、この3種類のライブラリを用いた。 30 40

#### 【0058】

ターゲットとなるh u m a n F c（I C N / C A P P E L社製、P U R I F I E D H U M A N I G G F C）は、商品名「s u l f o N H S - L C - B i o t i n」（ピアース社製）を用いてビオチン標識し、ストレプトアビジンでコートされた磁気ビーズ（商品名「D y n a b e a d s M 2 8 0 s t r e p t a v i d i n」、D y a n a l社製）に、ビオチン-ストレプトアビジン結合活性を利用して固定化した。この磁気ビーズは非特異的な結合を最低限にするため、2%（w/v）スキムミルク溶液（10mMリン酸バッファ、pH 7.4）に懸濁してブロッキングを行った。

#### 【0059】

この磁気ビーズを用いて、常法にしたがってファージディスプレイ法（選択操作3回）を 50

行い、配列番号165～207で表されるhuman Fcに結合性を有するペプチドのアミノ酸配列を決定した。

#### 【0060】

(2) 得られたペプチドのhuman Fcに対する結合性の確認  
ターゲットとなるhuman Fcを、コーニング社製ELISAプレート（高結合タイプ）に以下のようにして固定化した。human Fc（ICN/CAPPEL社製、PURIFIED HUMAN IGG FC）を100  $\mu$ g/mlとなるように炭酸バッファ（100 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.0）に溶解した溶液を調製し、この溶液を100  $\mu$ lずつプレートのウェルに入れて4℃で一晩放置して、human Fcフラグメントの固定化を行った。また、上記と同様にして、特異性の対照として、ニワトリ、ウサギ、ウマ、ヤギ由来の各種IgGのFcフラグメント（いずれもROCKLAND社製）を、コーニング社製ELISAプレート（高結合タイプ）に固定化した。

10

#### 【0061】

なお、ウェルは24列用い、1列は抗human Fc抗体用（ポジティブコントロール）に、1列はhuman Fcに結合性を有さないペプチドを呈示するファージ用（ネガティブコントロール）とし、残りの22列は、配列番号165～167、169、170、172、173、175～189で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示したファージ用とした。

#### 【0062】

一晩放置した後、各ウェル中の溶液を捨て、300  $\mu$ lのブロッキングバッファ（2%（w/v）スキムミルクPBS溶液）を、上記Fcフラグメント固定化ウェル、及びターゲット無しの空ウェル（コントロール用、24個）に加えて、2時間室温で放置した。

20

#### 【0063】

一方、各ファージ（上記22種のhuman Fcに結合性を有するペプチドを呈示した各ファージと、human Fcに結合性を有さないペプチドを呈示したファージ）溶液（10<sup>11</sup> pfu/ $\mu$ l）50  $\mu$ lをブロッキングバッファ650  $\mu$ lに加えて30分放置し、非特異的結合の低減前処理を行った。また、抗human Fc抗体（CAPPEL社製、rabbit anti human IgG Fc antiserum）30  $\mu$ lを650  $\mu$ lのブロッキングバッファに溶解し、同様に非特異的吸着低減処理を行った。

30

#### 【0064】

各ウェルのブロッキングバッファを捨て、PBS-Tween（0.1% Tween in PBS）で5回洗浄した後、上記の各ファージ溶液と抗human Fc抗体溶液を、human Fc固定化ウェル、各動物種Fcフラグメント固定化ウェル、コントロール用ウェルに100  $\mu$ lずつ加え、1時間軽く攪拌（20 rpm/min程度）しながら室温で放置した。

#### 【0065】

そして、各ウェル中の溶液を捨て、200  $\mu$ lのPBS-Tweenで6回洗浄した後、各ウェルに、下記の発色用の抗体を含む溶液を100  $\mu$ lずつ加え、穏やかに攪拌しながら1時間放置した。

40

#### 【0066】

・ペプチド呈示ファージを加えたウェル：商品名「anti M13 antibody HRP monoclonal conjugate」（Amersham Biosciences社製）を4  $\mu$ l/20 mlとなるようにブロッキングバッファに溶解した溶液。

#### 【0067】

・抗human Fc抗体を加えたウェル：商品名「HRP-anti rabbit antibody（Goat）」（CAPPEL社製）を0.2  $\mu$ l/mlとなるように2 mlのブロッキングバッファに溶解した溶液。

#### 【0068】

50

そして、各ウェル中の溶液を捨て、PBS-Tweenで6回洗浄した後、ABTS発色溶液（ABTS（和光純薬製）を0.22mg/mlとなるようにクエン酸バッファ（50mM、pH4.0）に溶解し、使用直前に1.8μl/mlとなるように30%過酸化水素水（和光純薬製）を加えたもの）を200μlずつ、各ウェルに加えて発色させて、吸光度（405nm）をプレートリーダー（「ARVO.SX」、ワラック社製）で測定した。その結果を図1に示す。なお、図1において、Y軸は各Fcフラグメント固定化ウェルの吸光度をコントロールのウェルの吸光度で割ったものである。

#### 【0069】

図1から、配列番号165～167、169、170、172、173、175～189で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示したファージは、human Fcに対する特異性が高いことが分かる。一方、ポジティブコントロールの抗体はhuman Fc以外にも結合しており、ポリクローナルの未吸収血清では特異性が低いことが分かる。

#### 【0070】

（3）得られた全てのペプチド（配列番号165～207）について、上記（2）と同様の方法（ELISA法）で、human Fcに対する結合性を調べた。その結果を表1に示す。なお、表1中の「発色値」は、human Fc（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（405nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405nm）を表し、「発色値」が大きいほど、human Fcに対する親和性が強いことを示す。

#### 【0071】

#### 【表1】

配列番号	発色値	配列番号	発色値
165	9.57	187	17.52
166	21.86	188	15.86
167	21.70	189	12.85
168	21.86	190	17.52
169	13.8	191	15.86
170	19.04	192	12.85
171	13.8	193	15.0
172	6.42	194	16.5
173	10.67	195	12.4
174	6.42	196	9.56
175	16.89	197	17.7
176	19.29	198	18.9
177	19.34	199	10.0
178	20.3	200	13.3
179	6.93	201	14.2
180	13.52	202	18.4
181	16.21	203	15.1
182	20.09	204	10.1
183	7.76	205	10.3
184	19.59	206	12.7
185	15.34	207	16.1
186	13.0		

#### 【0072】

表1から、配列番号165～207で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、human Fcに対する親和性が異なるものの、いずれもhuman Fcに対して結合力を

有していることが分かる。

【 0 0 7 3 】

(4) ペプチドの共通配列の検索

配列番号 1 6 5 ～ 2 0 7 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表 2 のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号 1 ～ 8 7 で表される共通配列を決定した。

【 0 0 7 4 】

【表 2】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めた めに使った配列 (配列番号)	共通配列 (配列番号)	共通配列を求めた めに使った配列 (配列番号)	共通配列 (配列番号)	共通配列を求めた めに使った配列 (配列番号)	共通配列 (配列番号)	共通配列を求めた めに使った配列 (配列番号)
1	165~167	2 3	179, 187	4 5	179, 201	6 7	200, 207
2	168, 169, 174	2 4	187, 194	4 6	188, 204	6 8	182, 200, 207
3	166, 170	2 5	189, 204	4 7	187, 188, 195	6 9	200, 207
4	171~173	2 6	201, 204	4 8	184, 206	7 0	199, 205
5	186	2 7	187, 189, 201	4 9	196, 197	7 1	175, 176, 203, 205
6	191	2 8	203, 206	5 0	179, 206	7 2	178, 195
7	192	2 9	184, 203	5 1	179, 184, 197	7 3	198, 205
8	193	3 0	179, 180, 194, 203	5 2	179, 197	7 4	199, 205
9	202	3 1	181, 206	5 3	179, 184	7 5	178, 203
1 0	189, 190	3 2	180, 203	5 4	196, 206	7 6	187, 194
1 1	177, 194	3 3	179, 206	5 5	179, 206	7 7	175, 176, 180, 201
1 2	198, 201	3 4	194, 206	5 6	184, 197	7 8	175, 176, 203
1 3	200, 207	3 5	184, 194	5 7	193, 196	7 9	175, 176, 203
1 4	198, 207	3 6	179, 197	5 8	188, 197	8 0	180, 181
1 5	175, 176, 184	3 7	179, 184	5 9	180, 194, 197	8 1	179, 195
1 6	180, 203	3 8	184, 197	6 0	177, 182, 185, 187, 19 8, 200, 201	8 2	179, 206
1 7	182, 205	3 9	187, 204	6 1	196, 207	8 3	195, 206
1 8	182, 203	4 0	189, 204	6 2	176, 205	8 4	179, 190
1 9	175, 176, 206	4 1	187, 200, 201	6 3	177, 207	8 5	183, 184
2 0	178, 188	4 2	187, 189, 201	6 4	196, 200, 201	8 6	182, 183
2 1	175, 176, 178	4 3	201, 204	6 5	187, 200, 201, 206	8 7	183, 203
2 2	175, 176, 188, 204	4 4	187, 200	6 6	196, 206		

10

20

30

40

50

## 【 0 0 7 5 】

## 実施例 2

実施例 1 の human Fc の代わりに、ヒト由来 IgG (CAPPEL 社製) そのものを用い、対照としてブタ、ウシ、マウス、ヤギ、ウサギ由来の各種 IgG (ROCKLAND 社製) を用いた以外は、実施例 1 の (2) と同様の方法で実験を行い、配列番号 165 ~ 167、169、170、172、173、175 ~ 189 で表されるアミノ酸配列



を有するペプチドのヒト由来 I g G に対する特異性を検討した。その結果を図 2 に示す。

【0076】

図 2 から分かるように、実施例 1 の場合とほぼ同様の結果が得られ、配列番号 165 ~ 167、169、170、172、173、175 ~ 189 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、ヒト由来 I g G そのものに対しても特異性が高いことが確認された。

【0077】

実施例 3

human Fc に対して結合性を有するペプチドを呈示したファージを作製し、このファージを用いて human Fc 及び human I g G に対する結合性を確認した。

【0078】

(1) 配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドがファージ (M13) の p I I I マイナーコートタンパクの N 末端に呈示されるように、以下の方法により、配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを指定する D N A 配列を、ファージゲノム上の p I I I 遺伝子のリーディング鎖 5' 末端側に組み込んだ。

【0079】

上記 D N A 配列を導入するための M13 D N A としては、M13 K E (New England Biolabs 社製) を改変したものをを用いた。この M13 K E (改変型) の p I I I 遺伝子の 5' 末端側、すなわち、配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを指定する D N A 配列を挿入する部分の塩基配列を配列番号 288 に示す。配列番号 288 に示される塩基配列において、1 ~ 54 番目の塩基配列は p I I I タンパク質の N 末端にあるシグナル配列 (V K K L L F A I P L V V P F Y S H S) をコードする部分、55 ~ 66 番目の塩基配列はファージ p I I I タンパクと呈示させるペプチドとの間にスペースを作るためのフレキシブルリンカーをコードする部分であり、それ以降 (67 番目以降) の塩基配列が実際の M13 p I I I タンパク質をコードする部分である。

【0080】

したがって、配列番号 288 に示される塩基配列の 1 ~ 54 番目の塩基配列部分と、55 ~ 66 番目の塩基配列部分との間に、配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド指定する D N A 配列を挿入するために、配列番号 289、290 に示される塩基配列を有するプライマー (プライマーの作製は S I G M A G E N O S I S 社に依頼) と、鋳型 M13 (改変型) 一本鎖 D N A を混合し、商品名「E x T a q」(T a K a R a 製) を用いて常法に従って P C R 反応を行った。

【0081】

配列番号 289 に示されるプライマーは、M13 K E (改変型) の p I I I 遺伝子の 5' 末端の塩基配列 (配列番号 288) 中、33 ~ 54 番目の塩基配列にアニーリングするように設計されたプライマーである。また、配列番号 290 に示されるプライマーの 1 ~ 21 番目の塩基配列は、配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド (K L Y H L S I) をコードし、22 ~ 43 番目の塩基配列は p I I I 遺伝子の 5' 末端の塩基配列 (配列番号 288) 中、55 ~ 76 番目の塩基配列の相補鎖にアニーリングするように設計されたプライマーである。

【0082】

P C R 反応終了後、増幅された M13 D N A (上記 D N A 配列が挿入された M13 D N A) の両末端を結合して、環状 2 本鎖 M13 D N A を構成するため、両末端を平滑化し、リン酸化し、リゲーション反応を行った。なお、この一連の反応は、商品名「B K L キット」(T a K a R a 社製) を用いた。

【0083】

(2) 組み込んだ M13 ファージゲノム D N A の大腸菌へのトランスフォーム

上記で得られたファージ 2 本鎖 D N A をエレクトロポレーションにより大腸菌にトランスフォームした。

【0084】

まず、リゲーションを行った M13 D N A 溶液から塩を除くため、エタノール沈殿法を行

10

20

30

40

50

い、滅菌済み超純水に再溶解した。ホストとなる大腸菌は J M 1 0 9 を用い、これを定法により予めエレクトロコンピテントセル（エレクトロポレーション用の前処理）とした。エレクトロポレーションは E C M 3 9 9（B T X 社製）のエレクトロポレーション用機器を用い、印可電圧は 2 5 0 0 V、キャパシタンス 2 5  $\mu$  F、キューベットの 2 m m 電極幅で行った。電圧を印可後、すぐに S O C 培地を 1 m l 加え試験管に移し、3 7  $^{\circ}$ C で 1 時間振とう培養を行った。

【0085】

（3）配列番号 1 6 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示したファージの選別

上記トランスフォームした大腸菌（J M 1 0 9）をアガロースストップ法によって選別した。トランスフォームされたかどうかはプラークによって確認できる（トランスフォームされた大腸菌（J M 1 0 9）は青色のプラークとなって識別される。）。 10

【0086】

すなわち、上記振とう培養後、培養液 3 0 0  $\mu$  l をアガロースストップ 3 m l に加えて攪拌し、直ちに I P T G と X - G a l を加えた L B プレート培地に上層し、数分乾燥後、ふたをして 3 7  $^{\circ}$ C で一晩放置した。

【0087】

出現したプラーク（1 2 個）を楊枝でつつき、それぞれ予め 6 0 0 n m の吸光度で 0 . 6 まで培養していた大腸菌（E R 2 5 3 7）5 m l（L B 培地）に入れ、これを 3 7  $^{\circ}$ C で 4 . 5 時間激しく振とう培養した。 20

【0088】

その後、それぞれの培養液を遠沈管に移して遠心（1 0 0 0 0 r p m、4  $^{\circ}$ C、1 0 m i n）し、上澄みを別の遠沈管に移し、更に同条件で再度遠心し、上澄みを別の遠沈管に移して上澄み液の 1 / 5 量の P E G  $\cdot$  N a C l 溶液（2 0 % P E G # 6 0 0 0 / 2 . 5 M N a C l）を加えて攪拌後、4  $^{\circ}$ C で一晩（4 時間以上）放置した。

【0089】

放置後、遠心（1 0 0 0 0 r p m、4  $^{\circ}$ C、1 0 m i n）して上澄みを捨て、沈殿を 1 m l の T B S バッファで溶解して 1 . 5 m l 容の遠心チューブに移し、遠心（1 0 0 0 0 r p m、4  $^{\circ}$ C、1 0 m i n）し、上澄みを別の 1 . 5 m l 容チューブに移して、2 0 0  $\mu$  l の P E G  $\cdot$  N a C l 溶液を加えて氷中で 3 0 分放置した。その後、遠心（1 0 0 0 0 r p m、4  $^{\circ}$ C、1 0 m i n）して上澄みを捨て、沈殿を 2 0 0  $\mu$  l の T B S バッファに溶解してそれぞれのファージ溶液を調製した。 30

【0090】

それぞれのファージ溶液 5 0  $\mu$  l を取り、常法に従ってファージの一本鎖 D N A を調製し、目的のペプチド（配列番号 1 6 6）が呈示されるファージであるかを、ダイ・プライマー法 D N A シークエンスによって確認した。

【0091】

シークエンスには、蛍光物質（C y 5）で 5' 末端を標識した配列番号 2 9 1 に示されるプライマー（プライマーの作製は S I G M A G E N O S I S 社に依頼）を用い、上記で調製したそれぞれの一本鎖 M 1 3 D N A を鋳型に、「T h e r m o S e q u e n a s e P r i m e r C y c l e S e q u e n c i n g K i t 7 - d e a z a d G T P」（A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 社製）でシークエンス反応後、「A L F e x p r e s s I I」（A m e r s h a m B i o s c i e n c e s 社製）で、p I I I 遺伝子の 5' 40

末端側の塩基配列を決定した。

【0092】

その結果、得られた全てのファージ（1 2 個）で、所定の箇所（配列番号 2 8 8 に示される塩基配列において、シグナル配列をコードする部分（1 ~ 5 4 番目の塩基配列）とフレキシブルリンカーをコードする部分（5 5 ~ 6 6 番目）との間）に、配列番号 1 6 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドの指定配列（A A A C T T T A T C A T T T A T C 50

T A T T) が挿入されていることが確認され、これらのファージが、p I I I マイナーコートタンパクのN末端に配列番号166で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示していることが確認された。

#### 【0093】

(4) 選別されたファージが human Fc 及び human IgG 本体に結合するかの確認実施例1(2)、及び実施例2と同様の方法で、選別されたファージの human Fc 及び human IgG 本体に対する結合性を確認した。その結果を表3に示す。なお、表3中の「発色値」は、ターゲット物質(human Fc 又は human IgG)固定化ウェルの吸光度(405nm)/コントロール(空)ウェルの吸光度(405nm)を表し、「発色値」が大きいほど、ターゲット物質に対する親和性が強いことを示す。 10

#### 【0094】

##### 【表3】

ターゲット物質	発色値
human Fc	14.4
human IgG	12.5

#### 【0095】

表3から、上記の方法により作製した配列番号166で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示するファージは、human Fc 及び human IgG に対して結合性を有することが分かる。 20

#### 【0096】

##### 実施例4

#### (1) HRP 標識されたファージの作製

ファージのHRP標識には、商品名「ActiZyme-HRP: Activated Peroxydase Kit」(ZYMED社製)を用い、以下のようにしてファージのHRP標識を行った。

#### 【0097】

商品名「ActiZyme-HRP: Activated Peroxydase Kit」(ZYMED社製)の「Activated Peroxydase」2mgを、1mlの100mM炭酸ナトリウムバッファ(pH9.0)に加えて溶解してPeroxidase溶液を調製し、このPeroxidase溶液500μlを、予め100mM炭酸ナトリウムバッファ(pH9.5)を500μl入れておいた1.5ml容エッペンドルフチューブに加えて混合し、Peroxidase濃度1mg/mlのPeroxidase溶液を調製した。このPeroxidase溶液500μlを、予め100mM炭酸ナトリウムバッファ(pH9.5)を500μl入れておいた1.5ml容エッペンドルフチューブに加えて混合し、Peroxidase濃度0.5mg/mlのPeroxidase溶液を調製した。同様の操作を行い、Peroxidase濃度0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/mlのPeroxidase溶液 30 40

#### 【0098】

一方、配列番号166で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示するファージを、常法に従って大腸菌に感染させて増幅し、 $10^{11}$  pfu ( $\equiv 10^{11}$  ファージ/1μl)濃度のファージ溶液を調製し、このファージ溶液500μlを1.5ml容エッペンドルフチューブに入れ、Peroxidase濃度1mg/mlのPeroxidase溶液500μlを加え、4℃で一晩インキュベートした。また、Peroxidase濃度0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/mlのPeroxidase溶液を用いて、同様にしてそれぞれファージのHRP標識を行った。

## 【0099】

インキュベート後、未反応の「Activated Peroxydase」を反応させるため、1 M Lysine 溶液を 400  $\mu$ l 加えて室温で2時間放置した。次に、余分な HRP や Lysine を除去するため、上記反応後のファージ溶液に、PEG 溶液 (20 % PEG #6000、2.5 M NaCl) 250  $\mu$ l を加えて攪拌し、氷中に30分放置した後、遠心 (10000 rpm、10分) して上清を除去し、PBS (10 mM リン酸、140 mM NaCl、pH 7.4) 1 ml を加えて沈殿を再懸濁した。この再懸濁液に、PEG 溶液を 200  $\mu$ l 加えて氷中に30分放置してから、遠心 (10000 rpm、10分) して上清を除去した。このような操作を3回繰り返して行い、最終的に得られた沈殿に PBS を 500  $\mu$ l 加えて懸濁し、HRP 標識されたファージ (HRP 標識ファージという) を含む溶液を得た。このようにして得られた HRP 標識ファージは、1ヶ月程度であれば冷蔵庫で保存可能であり、数ヶ月保存する場合は、50% となるようにグリセロールを加えて -20℃ で保存すればよい。

## 【0100】

## (2) human Fc の検出

上記 HRP 標識ファージを用いて、human Fc を検出できるかどうかを確認した。これによって、ヒト由来 IgG 自体の検出も可能であることが示唆される。

## 【0101】

まず、human Fc (ICN/CAPPEL 社製、PURIFIED HUMAN IgG Fc) を 100  $\mu$ g/ml となるように炭酸バッファ (100 mM NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.0) に溶解した溶液を調製し、この溶液を 100  $\mu$ l ずつ、96穴の ELISA プレート (コーニング社製、Costar 高結合タイプ、cat. No 9018) のウェルに入れて 4℃ で一晩放置して、human Fc フラグメントの固定化を行った。

## 【0102】

固定化後、各ウェル中の溶液を捨て、300  $\mu$ l のブロッキングバッファ (2% (w/v) スキムミルク PBS 溶液) を、human Fc 固定化ウェル、及び空ウェル (コントロール用) に加えて、室温で1時間放置した。

## 【0103】

一方、上記 HRP 標識ファージを含む溶液 50  $\mu$ l をブロッキングバッファ 200  $\mu$ l に加えて15分放置し、非特異的結合の低減前処理を行った。

## 【0104】

各ウェルのブロッキングバッファを捨て、PBS-Tween (0.1% Tween in PBS) で5回洗浄した後、上記の非特異的結合の低減前処理を行った HRP 標識ファージ溶液を、human Fc 固定化ウェル及びコントロール用ウェルに 100  $\mu$ l ずつ加え、軽く攪拌 (20 rpm/min 程度) しながら室温で1時間放置した。

## 【0105】

そして、各ウェル中の溶液を捨て、200  $\mu$ l の PBS-Tween で7回洗浄した後、ABTS 発色溶液 (ABTS (和光純薬製) を 0.22 mg/ml となるようにクエン酸バッファ (50 mM、pH 4.0) に溶解して作製し、使用直前に 1.8  $\mu$ l/ml となるように 30% 過酸化水素水 (和光純薬製) を加えたもの) を 200  $\mu$ l ずつ、各ウェルに加えて発色させて、吸光度 (405 nm) をプレートリーダー (「ARVO. SX」、ワック社製) で測定した。その結果を図3に示す。なお、図3において、Y軸は、human Fc 固定化ウェルの吸光度 (405 nm) / コントロール (空) ウェルの吸光度 (405 nm) を表し、X軸の1、2、3、4、5は、それぞれ Peroxydase 濃度が 1 mg/ml、0.5 mg/ml、0.25 mg/ml、0.125 mg/ml、0.0625 mg/ml の Peroxydase 溶液を用いて標識したファージの結果を表す。

## 【0106】

図3から、直接 HRP で標識した、配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプ

チドを呈示するファージを用いることにより、human Fcを検出できることが分かる。

#### 【0107】

##### 実施例 5

配列番号173で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示するファージを用いた以外は、実施例3と同様にしてファージのHRP標識を行い、human Fcの検出を行った。その結果を図4に示す。なお、図4において、Y軸は、human Fc固定化ウェルの吸光度(405nm)/コントロール(空)ウェルの吸光度(405nm)を表し、X軸の1、2、3、4、5は、それぞれPeroxidase濃度が1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml、0.0625mg/mlのPeroxidase溶液を用いて標識したファージの結果を表す。

#### 【0108】

図4から、直接HRPで標識した、配列番号173で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを呈示するファージを用いることにより、human Fcを検出できることが分かる。

#### 【0109】

以上の結果から、直接HRPで標識した、human Fcに対して結合性を有するペプチドを呈示したファージを用いることにより、human Fcを検出でき、二次抗体の代替品として十分に利用できることが示唆される。

#### 【0110】

##### 実施例 6

ターゲット物質として、ウマ由来IgGのFcフラグメント(以下、horse Fcと略記する。)を用いた以外は、実施例1の(1)と同様にしてファージディスプレイ法(選択操作4回)を行い、horse Fcに対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号208~212で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

#### 【0111】

得られた全てのペプチド(配列番号208~212)について、実施例1(2)と同様の方法(ELISA法)で、horse Fcに対する結合性を調べた。その結果を表4に示す。なお、表3中の「発色値」は、horse Fc(ターゲット物質)固定化ウェルの吸光度(405nm)/コントロール(空)ウェルの吸光度(405nm)を表し、「発色値」が大きいほど、horse Fcに対する親和性が強いことを示す。

#### 【0112】

##### 【表4】

配列番号	発色値
208	12.0
209	15.5
210	18.0
211	2.11
212	2.05

#### 【0113】

表4から、配列番号208~212で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、horse Fcに対する親和性が異なるものの、いずれもhorse Fcに対して結合性を有していることが分かる。

#### 【0114】

また、配列番号208~212で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表5のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号88~90で表される共通配列を決定した。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 5 】

【表 5】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
8 8	208
8 9	211, 212
9 0	209, 210

【 0 1 1 6 】

10

実施例 7

ターゲット物質として、ヒツジ由来 I g G の F c フラグメント（以下、s h e e p F c と略記する。）を用いた以外は、実施例 1 の（1）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作 4 回）を行い、s h e e p F c に対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号 2 1 3 ～ 2 1 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

【 0 1 1 7 】

得られた全てのペプチド（配列番号 2 1 3 ～ 2 1 6）について、実施例 1（2）と同様の方法（E L I S A 法）で、s h e e p F c に対する結合性を調べた。その結果を表 5 に示す。なお、表 6 中の「発色値」は、s h e e p F c（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（4 0 5 n m）／コントロール（空）ウェルの吸光度（4 0 5 n m）を表し、「発色値」が大きいほど、s h e e p F c に対する親和性が強いことを示す。

20

【 0 1 1 8 】

【表 6】

配列番号	発色値
213	2.08
214	5.11
215	2.93
216	2.04

30

【 0 1 1 9 】

表 6 から、配列番号 2 1 3 ～ 2 1 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、s h e e p F c に対する親和性が異なるものの、いずれも s h e e p F c に対して結合力を有していることが分かる。

【 0 1 2 0 】

また、配列番号 2 1 3 ～ 2 1 6 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表 7 のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号 9 1 ～ 9 3 で表される共通配列を決定した。

【 0 1 2 1 】

40

【表 7】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
9 1	213
9 2	214, 215
9 3	215, 216

【 0 1 2 2 】

実施例 8

50

ターゲット物質として、ウサギ由来 I g G の F c フラグメント（以下、r a b b i t F c と略記する。）を用いた以外は、実施例 1 の（１）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作 4 回）を行い、r a b b i t F c に対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号 2 1 7 ～ 2 2 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

【 0 1 2 3 】

得られた全てのペプチド（配列番号 2 1 7 ～ 2 2 0）について、実施例 1（２）と同様の方法（E L I S A 法）で、r a b b i t F c に対する結合性を調べた。その結果を表 8 に示す。なお、表 8 中の「発色値」は、r a b b i t F c（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（4 0 5 n m）／コントロール（空）ウェルの吸光度（4 0 5 n m）を表し、  
「発色値」が大きいほど、r a b b i t F c に対する親和性が強いことを示す。 10

【 0 1 2 4 】

【表 8】

配列番号	発色値
217	1.33
218	3.14
219	1.53
220	2.48

20

【 0 1 2 5 】

表 8 から、配列番号 2 1 7 ～ 2 2 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、r a b b i t F c に対する親和性が異なるものの、いずれも r a b b i t F c に対して結合力を有していることが分かる。

【 0 1 2 6 】

また、配列番号 2 1 7 ～ 2 2 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表 9 のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号 9 4 ～ 9 7 で表される共通配列を決定した。

【 0 1 2 7 】

【表 9】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
9 4	217
9 5	218
9 6	219
9 7	220

30

【 0 1 2 8 】

実施例 9

ターゲット物質として、モルモット由来 I g G の F c フラグメント（以下、g u i n e a p i g F c と略記する。）を用いた以外は、実施例 1 の（１）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作 4 回）を行い、g u i n e a p i g F c に対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号 2 2 1 ～ 2 2 7 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

【 0 1 2 9 】

得られた全てのペプチド（配列番号 2 2 1 ～ 2 2 7）について、実施例 1（２）と同様の方法（E L I S A 法）で、g u i n e a p i g F c に対する結合性を調べた。その結果を表 1 0 に示す。なお、表 1 0 中の「発色値」は、g u i n e a p i g F c（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（4 0 5 n m）／コントロール（空）ウェルの吸光度 50

40

50

(405 nm)を表し、「発色値」が大きいほど、guinea pig Fcに対する親和性が強いことを示す。

【0130】

【表10】

配列番号	発色値
221	1.49
222	7.36
223	4.76
224	10.6
225	9.66
226	5.20
227	4.72

10

【0131】

表10から、配列番号221～227で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、guinea pig Fcに対する親和性が異なるものの、いずれもguinea pig Fcに対して結合力を有していることが分かる。

【0132】

また、配列番号221～227で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表11のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号98～104で表される共通配列を決定した。

【0133】

【表11】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
98	221
99	222
100	223
101	227
102	224, 225
103	224, 226
104	225, 226

30

【0134】

実施例10

ターゲット物質として、ヤギ由来IgGのFcフラグメント（以下、goat Fcと略記する。）を用いた以外は、実施例1の(1)と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作4回）を行い、goat Fcに対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号228～232で表されるアミノ酸配列を同定した。

【0135】

得られた全てのペプチド（配列番号228～232）について、実施例1(2)と同様の方法（ELISA法）で、goat Fcに対する結合性を調べた。その結果を表12に示す。なお、表12中の「発色値」は、goat Fc（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（405 nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405 nm）を表し、「発色値」が大きいほど、goat Fcに対する親和性が強いことを示す。

【0136】

【表12】

40



配列番号	発色値
228	4.05
229	5.31
230	4.77
231	6.31
232	8.01

## 【0137】

表12から、配列番号228～232で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、g o a t F c に対する親和性が異なるものの、いずれも g o a t F c に対して結合力を有していることが分かる。

## 【0138】

また、配列番号228～232で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表13のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号105～108で表される共通配列を決定した。

## 【0139】

## 【表13】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
105	229
106	230
107	231
108	228, 232

20

## 【0140】

## 実施例11

ターゲット物質として、ネコ由来 I g G の F c フラグメント（以下、c a t F c と略記する。）を用いた以外は、実施例1の（1）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作4回）を行い、c a t F c に対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号233～248で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

## 【0141】

得られた全てのペプチド（配列番号233～248）について、実施例1（2）と同様の方法（ELISA法）で、c a t F c に対する結合性を調べた。その結果を表14に示す。なお、表14中の「発色値」は、c a t F c （ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（405nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405nm）を表し、「発色値」が大きいほど、c a t F c に対する親和性が強いことを示す。

## 【0142】

## 【表14】

40

配列番号	発色値	配列番号	発色値
233	6.23	241	5.58
234	2.68	242	8.79
235	3.19	243	6.84
236	4.32	244	3.45
237	3.90	245	3.27
238	5.11	246	4.10
239	5.94	247	3.08
240	4.52	248	30.4

10

## 【0143】

表14から、配列番号233～248で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、c a t F cに対する親和性が異なるものの、いずれもc a t F cに対して結合力を有していることが分かる。

## 【0144】

また、配列番号233～248で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表15のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号109～131で表される共通配列を決定した。

## 【0145】

20

## 【表15】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるた めに使った配列 (配列番号)	共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるた めに使った配列 (配列番号)
109	233	121	242, 243, 245
110	234	122	236, 244
111	235	123	241, 243
112	238, 240, 242, 243	124	244, 247
113	241, 242	125	241, 246
114	243, 245, 247	126	240, 241
115	239, 243	127	236, 239
116	242, 247	128	239, 244
117	236, 237, 241	129	236, 237, 241, 244
118	244, 246	130	246, 248
119	236, 237, 238	131	236, 237, 240
120	242, 248		

30

## 【0146】

40

## 実施例12

ターゲット物質として、イヌ由来I g GのF cフラグメント（以下、d o g F cと略記する。）を用いた以外は、実施例1の（1）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作4回）を行い、d o g F cに対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号249～261で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

## 【0147】

得られた全てのペプチド（配列番号249～261）について、実施例1（2）と同様の方法（E L I S A法）で、d o g F cに対する結合性を調べた。その結果を表16に示す。なお、表16中の「発色値」は、d o g F c（ターゲット物質）固定化ウェルの吸

50

光度（405nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405nm）を表し、「発色値」が大きいほど、dog Fcに対する親和性が強いことを示す。

【0148】

【表16】

配列番号	発色値	配列番号	発色値
249	7.38	256	7.12
250	6.45	257	8.92
251	7.53	258	4.27
252	6.76	259	7.12
253	8.92	260	4.56
254	9.12	261	7.77
255	7.67		

10

【0149】

表16から、配列番号249～261で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、dog Fcに対する親和性が異なるものの、いずれもdog Fcに対して結合力を有していることが分かる。

【0150】

また、配列番号249～261で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表17のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号132～151で表される共通配列を決定した。

20

【0151】

【表17】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるた めに使った配列 (配列番号)	共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるた めに使った配列 (配列番号)
132	249	142	254, 260, 261
133	250	143	251, 256
134	257	144	251, 252
135	252, 254, 259	145	251, 255
136	252～254	146	253, 259
137	252, 256	147	258, 260, 261
138	255, 256	148	260, 261
139	253, 258	149	256, 260, 261
140	253, 255	150	259～261
141	253, 256	151	251, 259

30

【0152】

実施例13

ターゲット物質として、ウシ由来IgGのFcフラグメント（以下、bovine Fcと略記する。）を用いた以外は、実施例1の（1）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作4回）を行い、bovine Fcに対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号262～267で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

40

【0153】

得られた全てのペプチド（配列番号262～267）について、実施例1（2）と同様の方法（ELISA法）で、bovine Fcに対する結合性を調べた。その結果を表18に示す。なお、表18中の「発色値」は、bovine Fc（ターゲット物質）固定

50

化ウェルの吸光度（405 nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405 nm）を表し、「発色値」が大きいほど、bovine Fcに対する親和性が強いことを示す。

【0154】

【表18】

配列番号	発色値
262	7.03
263	6.62
264	5.00
265	4.61
266	5.42
267	3.05

10

【0155】

表18から、配列番号262～267で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、bovine Fcに対する親和性が異なるものの、いずれもbovine Fcに対して結合力を有していることが分かる。

【0156】

また、配列番号262～267で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表19のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号152～156で表される共通配列を決定した。

【0157】

【表19】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
152	262, 263
153	262, 264
154	264, 265
155	266
156	267

30

【0158】

実施例14

ターゲット物質として、ブタ由来IgGのFcフラグメント（以下、swine Fcと略記する。）を用いた以外は、実施例1の（1）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作4回）を行い、swine Fcに対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号268～277で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

【0159】

得られた全てのペプチド（配列番号268～277）について、実施例1（2）と同様の方法（ELISA法）で、swine Fcに対する結合性を調べた。その結果を表20に示す。なお、表20中の「発色値」は、swine Fc（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（405 nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405 nm）を表し、「発色値」が大きいほど、swine Fcに対する親和性が強いことを示す。

【0160】

【表20】

40

配列番号	発色値	配列番号	発色値
268	2.31	273	2.69
269	4.07	274	3.48
270	4.79	275	4.43
271	4.59	276	3.33
272	2.55	277	6.21

## 【0161】

表20から、配列番号268～277で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、swine Fcに対する親和性が異なるものの、いずれもswine Fcに対して結合力を有していることが分かる。

## 【0162】

また、配列番号268～277で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表21のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号157～162で表される共通配列を決定した。

## 【0163】

## 【表21】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
157	268
158	269, 270
159	269, 271, 272, 275～277
160	270, 273
161	273, 274
162	273, 274

20

## 【0164】

## 実施例15

ターゲット物質として、マウス由来IgGのFcフラグメント（以下、mouse Fcと略記する。）を用いた以外は、実施例1の（1）と同様にしてファージディスプレイ法（選択操作4回）を行い、mouse Fcに対して結合性を有するペプチドのスクリーニングを行い、配列番号278～280で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列を同定した。

30

## 【0165】

得られた全てのペプチド（配列番号278～280）について、実施例1（2）と同様の方法（ELISA法）で、mouse Fcに対する結合性を調べた。その結果を表22に示す。なお、表22中の「発色値」は、mouse Fc（ターゲット物質）固定化ウェルの吸光度（405nm）／コントロール（空）ウェルの吸光度（405nm）を表し、

40

## 【0166】

## 【表22】

配列番号	発色値
278	2.21
279	3.78
280	1.40

## 【0167】

50

表 2 2 から、配列番号 2 7 8 ～ 2 8 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドは、mouse Fc に対する親和性が異なるものの、いずれも mouse Fc に対して結合力を有していることが分かる。

【 0 1 6 8 】

また、配列番号 2 7 8 ～ 2 8 0 で表されるアミノ酸配列を有するペプチドのアミノ酸配列から、表 2 3 のような組み合わせで共通配列の検索を行い、配列番号 1 6 3 ～ 1 6 4 で表される共通配列を決定した。

【 0 1 6 9 】

【表 2 3】

共通配列 (配列番号)	共通配列を求めるために 使った配列 (配列番号)
1 6 3	280
1 6 4	278, 279

10

【 0 1 7 0 】

「配列表フリーテキスト」

配列番号 1 ～ 8 7 : ファージディスプレイ法で得られたヒト由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 8 8 ～ 9 0 : ファージディスプレイ法で得られたウマ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。 20

配列番号 9 1 ～ 9 3 : ファージディスプレイ法で得られたヒツジ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 9 4 ～ 9 7 : ファージディスプレイ法で得られたウサギ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定されたアミノ酸配列である。

配列番号 9 8 ～ 1 0 4 : ファージディスプレイ法で得られたモルモット由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 1 0 5 ～ 1 0 8 : ファージディスプレイ法で得られたヤギ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 1 0 9 ～ 1 3 1 : ファージディスプレイ法で得られたネコ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。 30

配列番号 1 3 2 ～ 1 5 1 : ファージディスプレイ法で得られたイヌ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 1 5 2 ～ 1 5 6 : ファージディスプレイ法で得られたウシ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 1 5 7 ～ 1 6 2 : ファージディスプレイ法で得られたブタ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 1 6 3 ～ 1 6 4 : ファージディスプレイ法で得られたマウス由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドから決定された共通配列である。

配列番号 1 6 5 ～ 2 0 7 : ファージディスプレイ法によって得られた、ヒト由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。 40

配列番号 2 0 8 ～ 2 1 2 : ファージディスプレイ法によって得られた、ウマ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 2 1 3 ～ 2 1 6 : ファージディスプレイ法によって得られた、ヒツジ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 2 1 7 ～ 2 2 0 : ファージディスプレイ法によって得られた、ウサギ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 2 2 1 ～ 2 2 7 : ファージディスプレイ法によって得られた、モルモット由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 2 2 8 ～ 2 3 2 : ファージディスプレイ法によって得られた、ヤギ由来 I g G の 50

F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 233～248：ファージディスプレイ法によって得られた、ネコ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 249～261：ファージディスプレイ法によって得られた、イヌ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 262～267：ファージディスプレイ法によって得られた、ウシ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 268～277：ファージディスプレイ法によって得られた、ブタ由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 278～280：ファージディスプレイ法によって得られた、マウス由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。 10

配列番号 281～287：非特許文献 1 に記載されたヒト由来 I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチドである。

配列番号 288：M13KE（改変型）の p I I I 遺伝子の 5' 末端側の塩基配列である。

配列番号 289：M13KE（改変型）の p I I I 遺伝子の 5' 末端の塩基配列（配列番号 288）中、33～54 番目の塩基配列にアニーリングするように設計されたプライマーである。

配列番号 290：配列番号 166 で表されるアミノ酸配列を有するペプチド（K L Y H L S I）をコードする塩基配列を含み、かつ p I I I 遺伝子の 5' 末端の塩基配列（配列番号 288）中、55～76 番目の塩基配列の相補鎖にアニーリングするように設計されたプライマーである。 20

配列番号 291：M13DNA のシーケンス用のプライマーである。

#### 【0171】

#### 【発明の効果】

以上説明したように本発明によれば、上記の I g G の F c フラグメントに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示しているファージを、I g G の検出手段として用いることにより、抗 I g G 抗体を用いた検出系に比べて、より安価な I g G の検出系を提供できる。また、抗 I g G 抗体のような品質のばらつきがないので、より安定した I g G の検出系を提供できる。

#### 【0172】

#### 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> PEPTIDE DOOR Co., Ltd.

<120> IgGに結合性を有するペプチド又は該ペプチドを表面に呈示したファージ  
を用いたIgGの検出方法

10

<130> MP-1571

<160> 291

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

20

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Phe or Tyr

40

<220>



<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for His or Phe

<400> 1

10

Lys Leu Xaa Xaa Leu Ser

1 5

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

30

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Val or Thr

<400> 2

40

Lys Thr Tyr Xaa Ser

1

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

10

&lt;220&gt;

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

20

&lt;222&gt; (1)..(1)

&lt;223&gt; Xaa stands for Lys or Arg

&lt;400&gt; 3

Xaa Leu Tyr His Leu

30

1

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

40

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Ile or Lys

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ser or Thr

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Phe or Gln

30

<400> 4

Gly Trp Xaa Xaa Val Xaa Leu

1

5

40

<210> 5

<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<400> 5

Gly Leu Tyr Thr Ser Ser Leu Arg Phe Trp Pro Pro  
1 5 10

20

<210> 6  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<400> 6

Ala Trp Arg Thr Ser Thr Leu Ser Ser His Val Pro  
1 5 10

40

<210> 7  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<400> 7

Lys Leu Tyr Ser Ser Gln Pro Gln Trp Leu Leu Pro  
1 5 10

20

<210> 8  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<400> 8

Gly Val Tyr Thr Ser His Met Ala Asn Trp Ser Met  
1 5 10

40

<210> 9  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<400> 9

Gly Tyr Ile Lys Ser Ser Leu Ser Ala Asn Thr Thr  
1 5 10

20

<210> 10  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2)..(2)  
<223> Xaa stands for Thr or Gln

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3).. (3)

<223> Xaa stands for Thr or Asn

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa stands for Arg or Ile

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa stands for Ser or Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa stands for Val or Leu

30

<400> 10

40

Pro Xaa Xaa Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Ser

1

5

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

10

&lt;220&gt;

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

20

&lt;222&gt; (2)..(2)

&lt;223&gt; Xaa stands for Ala or Thr

&lt;400&gt; 11

Arg Xaa Ser Thr Leu

30

1

5

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

40



<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 12

Ser His Leu Ser

10

1

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 13

30

Ser His Leu His

1

<210> 14

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ser or His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Phe or Pro

<400> 14

Ser His Leu Xaa Xaa Pro

1 5

30

<210> 15

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 15

Ser Ile Ser Ser

1

10

<210> 16

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

30

<223> Xaa stands for Thr or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

40

<223> Xaa stands for Ser or Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Phe or Ala

<400> 16

10

Ser Leu Xaa Xaa Xaa Leu Ser

1

5

<210> 17

20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat

30

orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Gln or Ser

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Val or Ala

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Ala or Asn

<400> 17

Ser Leu Xaa Xaa Xaa Thr Thr

1

5

<210> 18

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Gln or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Val or Tyr

10

<400> 18

Ser Ser Leu Xaa Xaa Ala

1 5

20

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ser or Arg

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Tyr or Phe

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Ser or Trp

20

<400> 19

Ser Ser Leu Xaa Xaa Xaa Pro

1

5

<210> 20

30

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

40

<400> 20

Ser Ser Ser Met

1

<210> 21

10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Leu or Met

30

<400> 21

Ser Ser Ser Xaa Ser

1

5

<210> 22

40

<211> 6



<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa stands for Leu, Met or Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa stands for Ser, Val or Tyr

20

<400> 22

30

Ser Ser Ser Xaa Xaa Tyr  
1 5

<210> 23  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

40

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 23

Ser Tyr Leu Ser

1

<210> 24

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 24

Thr Tyr Ser Ser

1

<210> 25

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

10

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Arg or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Val or Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Ser or Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

40

<222> (8)..(8)

<223> Xaa stands for Phe or Tyr

<400> 25

Thr Tyr Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Ala  
1 5

<210> 26

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Leu or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for His or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa stands for Leu or Ile

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa stands for Ser or Tyr

10

<400> 26

Thr Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Tyr  
1 5

20

<210> 27  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)

40

<223> Xaa stands for Ser, Arg or Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Tyr, Ser or His

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Leu or Val

20

<400> 27

Thr Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Ser

1 5

30

<210> 28

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

40

<400> 28

Thr Ser Ser Leu

1

<210> 29

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ile or Leu

<400> 29

Thr Ser Ser Xaa Ser

1

5

<210> 30

<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Tyr, Phe, Thr or Ser

20

<400> 30

Thr Ser Xaa Leu Ser

1 5

<210> 31

30

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

40



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Val or Ser

<400> 31

10

Thr Ser Xaa Leu Arg

1 5

<210> 32

<211> 6

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Phe or Ser

<400> 32

40

Thr Ser Xaa Leu Ser Tyr

1 5

<210> 33

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

20

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Tyr or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Ser or Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

40

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Val or Phe

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Leu or Trp

10

<400> 33

Thr Ser Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Pro

1 5

20

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Thr or Ser

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5).. (5)

<223> Xaa stands for Ser or Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa stands for Ser or Phe

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa stands for His or Trp

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa stands for Val or Pro

30

<400> 34

Thr Ser Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro

1

5

40

<210> 35

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Ser or Thr

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ile or Leu

30

<400> 35

Thr Ser Xaa Xaa Ser Ser

1

5

40

<210> 36

<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Tyr or Lys

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Leu or Met

<400> 36

30

Thr Ser Xaa Xaa Ser Val

1 5

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Tyr or Ser

<220>

20

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Leu or Ile

<220>

30

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Val or Ser

<400> 37

Thr Ser Xaa Xaa Ser Xaa Leu

40

1

5

<210> 38  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (3)..(3)  
<223> Xaa stands for Ser or Lys

20

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa stands for Ile or Met

30

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa stands for Ser or Val

40



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Leu or Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa stands for Gly or Asn

<400> 38

Thr Ser Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Thr

1

5

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 39

Thr Tyr Ser Ser

1

<210> 40

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

20

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Arg or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Val or Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

40

<223> Xaa stands for Ser or Tyr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa stands for Phe or Tyr

10

<400> 40

Thr Tyr Xaa Ser Ser Xaa Xaa Xaa Ala

1 5

20

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Ser, Val or Leu

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Tyr or His

<400> 41

10

Thr Tyr Xaa Ser Xaa Leu

1

5

<210> 42

<211> 7

20

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Ser, Arg or Leu

<220>

40

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Tyr, Ser or His

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Leu or Val

10

<400> 42

Thr Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Ser

1 5

20

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

30

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Leu or Ser

40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa stands for His or Ser

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa stands for Leu or Ile

20

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa stands for Ser or Tyr

<400> 43

30

Thr Tyr Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Tyr  
1 5

<210> 44  
<211> 11  
<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

10

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Ser or Val

<220>

20

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Tyr or His

<220>

30

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Ser or His

<220>

40

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa stands for Ser or Asn

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9).. (9)

<223> Xaa stands for His or Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (10).. (10)

<223> Xaa stands for Thr or Leu

<400> 44

Thr Tyr Xaa Ser Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Pro

1

5

10

<210> 45

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

10

20

30

40



<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Val or His

<400> 45

10

Tyr Leu Ser Xaa Leu

1 5

<210> 46

<211> 7

<212> PRT

20

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

30

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Met or Ile

<220>

<221> MISC\_FEATURE

40

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Val or Tyr

<400> 46

Tyr Ser Ser Ser Xaa Xaa Tyr

1

5

10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

30

<223> Xaa stands for Tyr, Ser or Gln

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Leu, Met or Pro

40

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (6)..(6)  
<223> Xaa stands for Ser, Val or Gln

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (7)..(7)  
<223> Xaa stands for Ser, Tyr or Trp

20

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (8)..(8)  
<223> Xaa stands for His, Gln or Leu

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (9)..(9)  
<223> Xaa stands for Thr, Pro or Leu

30

<400> 47

Tyr Ser Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro  
1 5 10

40

<210> 48  
<211> 4  
<212> PRT  
<213> Artificial

10

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 48

Tyr Thr Ser Ser

20

1

<210> 49  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)

40

<223> Xaa stands for His or Lys

<400> 49

Tyr Thr Ser Xaa Met

1

5

10

<210> 50

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

30

<223> Xaa stands for Tyr or Ser

<400> 50

Tyr Thr Ser Xaa Leu

1

5

40

<210> 51  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa stands for Tyr, Ser or Lys

20

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa stands for Leu, Ile or Met

30

<400> 51

Tyr Thr Ser Xaa Xaa Ser  
1 5

40

<210> 52

<211> 7  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>  
<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> Xaa stands for Tyr or Lys

20

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (5)..(5)  
<223> Xaa stands for Leu or Met

<400> 52

30

Tyr Thr Ser Xaa Xaa Ser Val  
1 5

<210> 53  
<211> 8  
<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

10

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Tyr or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Leu or Ile

<220>

30

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Val or Ser

<400> 53

40

Tyr Thr Ser Xaa Xaa Ser Xaa Leu



1

5

<210> 54

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial

10

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for His or Ser

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

30

<223> Xaa stands for Met or Leu

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Ala or Arg

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Asn or Phe

<400> 54

10

Tyr Thr Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Trp

1

5

<210> 55

20

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Tyr or Ser

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6).. (6)

<223> Xaa stands for Ser or Arg

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7).. (7)

<223> Xaa stands for Val or Phe

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8).. (8)

<223> Xaa stands for Leu or Trp

20

<400> 55

Tyr Thr Ser Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Pro

1 5

30

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ser or Lys

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa stands for Ile or Met

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Ser or Val

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa stands for Leu or Asn

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa stands for Gly or Asn

<400> 56

Tyr Thr Ser Xaa Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Thr  
1 5 10

10

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<400> 57

30

Ala Asn Trp Ser Met  
1 5

<210> 58

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

40

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10

<222> (2)..(2)

<223> Xaa stands for Asn or Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

20

<222> (4)..(4)

<223> Xaa stands for Ser or Thr

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Ser or Lys

<400> 58

Ala Xaa Tyr Xaa Ser Xaa Met

1

5

40

<210> 59  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (2)..(2)

<223> Xaa stands for Ser, Trp or Val

20

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Leu, Arg or Tyr

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Phe, Thr or Lys

40

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa stands for Leu or Met

<400> 59

Ala Xaa Xaa Thr Ser Xaa Xaa Ser

1 5

10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

20

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

<220>

<221> MISC\_FEATURE

30

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Arg, Lys, Tyr or Val

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (4)..(4)

40

<223> Xaa stands for Ala, Val, Leu, Ser or Lys



<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa stands for Thr, Ser, His or Tyr

10

<400> 60

Gly Thr Xaa Xaa Ser Xaa Leu

1 5

20

<210> 61

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Peptide binding to human IgG Fc fragment obtained from a combinat  
orial phage display peptide library

30

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa stands for Tyr or Arg

40